

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2670996号

(45) 発行日 平成9年(1997)10月29日

(24) 登録日 平成9年(1997)7月11日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 8 B 37/08			C 0 8 B 37/08	Z
// A 6 1 L 15/44			A 6 1 L 15/03	

請求項の数6(全 7 頁)

(21) 出願番号	特願平8-357953	(73) 特許権者	597014062
(62) 分割の表示	特願昭63-507745の分割		ジェンザイム コーポレイション
(22) 出願日	昭和63年(1988)8月26日		アメリカ合衆国 02111 マサチューセ
			ッツ, ボストン, ニーランド ストリー
			ト 75
(65) 公開番号	特開平9-183804	(72) 発明者	ハミルトン, レイモンド ジー.
(43) 公開日	平成9年(1997)7月15日		アメリカ合衆国 02143 マサチューセ
(31) 優先権主張番号	1 0 0 1 0 4		ッツ, サマービル, ビーコン ストリー
(32) 優先日	1987年9月18日		ト 30
(33) 優先権主張国	米国 (U S)	(72) 発明者	フォクス, エレン エム.
			アメリカ合衆国 02920 ロードアイラ
			ンド, クランストン, ジニア ドライブ
			80
		(74) 代理人	弁理士 倉内 基弘 (外1名)
		審査官	弘 實 謙二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸の水不溶性誘導体

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 HAを含み、実質的に架橋が存在しない水不溶性組成物。

【請求項2】 実質的に二官能価或は多官能価求核性試薬が存在せずかつ実質的に二官能価或は多官能価求電子性試薬が存在しない請求項1に記載の組成物。

【請求項3】 HAと、活性化剤と、求核性試薬との反応生成物を含む水不溶性組成物。

【請求項4】 前記活性化剤がカルボジイミドである請求項3に記載の組成物。

【請求項5】 更に、検出可能なマーカを含む請求項1に記載の組成物。

【請求項6】 更に、製薬的に活性な物質を含む請求項1に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

2

【0001】

【発明の背景】本発明は化学的に改質したヒアルロン酸から生成するバイオ適合性フィルム及びゲルに関する。ヒアルロン酸(「HA」)は天然産のムコ多糖で、例えば滑液、硝子体液、血管壁及びへそ帯及びその他の連結組織中に見られる。多糖は交互N-アセチル-D-グルコサミン及びD-グルクロン酸残基が交互β1-3グルクロンジック及びβ1-4グルコサミニジック結合によって結合されてなり、それで反復単位は-(1→4)-β-D-GlcA-(1→3)-β-D-GlcNAc-である。ヒアルロン酸は水に溶解して高粘性流体を形成する。天然源から単離したヒアルロン酸の分子量は5×10<sup>4</sup>~1×10<sup>7</sup>ダルトンまでの範囲内に入るのが普通である。

【0002】本明細書中で用いる通りの「HA」なる用

10

語はヒアルロン酸及びそのヒアルロネート塩、例えばヒアルロン酸ナトリウム（ナトリウム塩）、ヒアルロン酸カリウム、ヒアルロン酸マグネシウム及びヒアルロン酸カルシウムを含む任意のものを意味する。

【0003】HAは化学的に改質した（「誘導化した」）形で外科用エイド（補助剤）として有用であり、手術後の期間中に体組織が癒着或は付着するのを防ぐ。誘導化したHAゲル或はフィルムを、分離したままにして相互に癒着しないようにする組織の間の場所に注入或は挿入する。ゲルは、有効であるには、決まった場所に留まり、ゲルが終局的に分散しかつ組織が接触するようになって、組織がもはや癒着する傾向をもたなくなるように十分長い時間、組織を接触させないようにしなければならない。

【0004】化学的に改質したHAは、また、徐放薬剤送達用に有用になることができる。Balasz等の米国特許4,582,865号（1986年）は、「HA」の架橋ゲルはその中に分散され、ゲル高分子マトリックに共有結合されていない低分子量物質の放出の速度を落とすことができると記述している。R.V. Sparer等は、ニューヨーク在Marcel Dekker, Inc., T.J. Roseman等のControlled Release Delivery Systems, 1983年、6章、107～119頁において、直接か或はアラニンブリッジを中間結合基として含むエステル錯体におけるかのいずれかでエステル結合を経てヒアルロン酸に共有結合させたクロラムフェニコールの開放が持続されることを記載している。

【0005】I. Danishefsky等、Carbohydrate Res., 1971年、16巻、199～205頁は、ムコ多糖とアミノ酸エステルとを1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド（「EDC」）の存在において水溶液中で反応させてムコ多糖のカルボキシル基を置換されたアミドに転化することによってムコ多糖を改質することを記載している。彼等はグリシンメチルエステルとHAを含む種々の多糖とを反応させた。生成した生成物は水溶性である、すなわち、水或は体組織の間に遭遇するような水性環境に迅速に分散する。

【0006】HA組成物の水溶性を減少させる提案はHAを架橋させることを含む。R.V. Sparer等は、ニューヨーク、Marcel Dekker, Inc., R.J. Roseman等、Controlled Release Delivery Systems, 1983年、6章、107～119頁において、システイン残基をHAにアミド結合を経て結合させ、次いで結合させたシステイン残基の間にジスルフィド結合を形成することによってシステイン改質したHAを架橋させることによってHAを改質することを記載している。システイン改質したHAはそれ自体水溶性であり、かつ酸化によってジスルフィド形に架橋させた場合にのみ不溶性になった。

【0007】De Bellder等のPCT公表第WO 86/

00912号は、カルボキシル含有多糖に二或は多官能価エポキシドを架橋させて作る。手術後の組織癒着を防止する分解のおそいゲルを記載している。水溶性の減少したHAの架橋ゲルを作るのに提案された他の反応性の二或は多官能価試薬は下記を含む：50℃のアルカリ性媒質中の1, 2, 3, 4-ジエポキシブタン（T.C. Laurent等、1964年、Acta Chem Scand., 18巻、174頁）；アルカリ性媒質中のジビニルスルホン（E.A. Balasz等、米国特許4,582,865号（1986年））；ホルムアルデヒド、ジメチロールウレア、ジメチロールエチレンウレア、エチレンオキシド、ポリアジリジン及びポリイソシアネート（E.A. Balasz等、英国特許出願第8420560（1984年））を含む種々の他の試薬、T. MaIson等のPCT公表第WO 86/00079号（1986年）は、HAを二或は多官能価エポキシドのような二或は多官能価試薬と反応させて、代用硝子体液として用いるためのHAの架橋ゲルを作ること記載している。T. MaIson等のEPO 0193510号（1986年）は、架橋HAゲルを真空乾燥或は圧縮して造形品を作ること記載している。

【0008】

【発明の要約】総括的には、発明は、一態様において、水不溶性のバイオ適合性ゲルの製造方法、HAを活性化剤で活性化して活性化HAを生成し及び活性化HAを求核性試薬と水不溶性のバイオ適合性ゲルを生成する条件下で反応させることを含む方法の特徴とする。

【0009】好ましい実施態様では、活性化及び反応は同時に行われる。活性化はHAを含む水性混合物を準備し、酸を加えて水性混合物のpHを4.0～5.0に下げ、次いで水性混合物に活性化剤を接触させることを含む。水性混合物はHAを濃度0.4～2.6%W/Wの範囲で含む。酸は塩酸を含む。HA及び活性化剤は、活性化する間、活性化剤少なくとも0.2モル当量対HAのグルクロン酸残基1モル当量のモル比で存在し、活性化HA及び求核性試薬は反応工程において、求核性試薬少なくとも0.2モル当量対活性化HAのグルクロン酸残基1モル当量のモル比で存在する。活性化剤はカルボジイミド（好ましくは、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド或は1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドメチオジド）を含む。求核性試薬は下記を含む：アミノ酸アミド（好ましくはロイシニアミドヒドロクロリド）、一官能価アミン（好ましくはアニリン）、アミノ酸、アミノ酸の塩、或は下記を含む群から選ぶアミノ酸のエステル（好ましくはメチルエステル或はト-ブチルエステルを含むブチルエステル）：ロイシン、バリン、イソロイシン、アルギニン、プロリン、ヒスチジン或はフェニルアラニン（好ましくはL-ロイシンメチルエステルヒドロクロリド、L-バリンメチルエステルヒドロクロリド、L-イソロイシンメチルエステルヒドロクロリド、L-

アルギニンメチルエステルヒドロクロリド、L-プロリンメチルエステルヒドロクロリド、L-ヒスチジンメチルエステルヒドロクロリド、L-フェニルアラニンヒドロクロリド、或はL-ロイシン- $\gamma$ -ブチルエステルヒドロクロリド)。方法は更に検出可能なマーカ（好ましくは、「Brilliant Blue R」を含む。アミノ酸を染色する染料）を混和することを含む。

【0010】発明は、別の態様では、上述した方法に従って作るゲルを特徴とする。発明は、別の態様では、バイオ適合性ゲルを準備し、ゲルを乾燥し或はゲルから水を逃散させる条件下でゲルを圧縮することを含む、水不溶性のバイオ適合性フィルムの製造方法の特徴とする。

【0011】発明は、別の態様では、上述した方法に従って作るフィルムを特徴とする。発明は、別の態様では、HAを含み、実質的に架橋が存在しない。実質的に二官能価或は多官能価求核性試薬が存在しない、実質的に二官能価或は多官能価の求電子性試薬が存在しない水不溶性組成物の特徴とする。好ましい実施態様では、組成物は、更に、一官能価アミンを含む一官能価求核性試薬、検出可能なマーカー、医薬上活性な物質（好ましくは、HAに共有結合しているか或は組成物内に分散しているかのいずれか及び組成物に共有していない）を含む。

【0012】発明は、別の実施態様では、HAと、活性化剤と、求核性試薬との反応生成物を含む水不溶性組成物の特徴とする。本明細書中で使用する通りの「フィルム」なる用語はゲルを圧縮して或はゲルを脱水させて形成する物質を意味し、発明の全てのゲルはこのようなフィルムに成形することができる。

【0013】「バイオ適合性」物質とは、その用語を本明細書中で用いる場合、医学上容認し得ない毒性或は有害な作用を生物学的機能に与えないものである。

【0014】本発明者等は、HAを適当な活性化剤及び求核性試薬で処理することによって、二-或は多官能価架橋試薬を何ら使用しないで、HAのカルボキシル基を共有的に改質した水溶性の減少したゲル或はフィルムを作り得ることを見出した。「水溶性」ゲル或はフィルムとは、その用語を本明細書中で用いる場合、水中ヒアルロン酸ナトリウム1%重量/重量（「w/w」）の水溶液を乾燥し、3cm×3cm×0.3mmの寸法を有するように作り、20℃の蒸留水50mlのビーカーに入れて攪拌しないで静置させた際に、フィルムとしてのその構造上の結合性を3分後に失い、20分以内に全体が分散されるようになるものである。発明の「水不溶性」フィルムとは、その語句及び同様の用語を本明細書中で用いる場合、HAの1%水溶液を使用し、発明に従って改質し、同じ寸法を有するように形成し、同様に20℃の蒸留水50mlのビーカー中に攪拌しないで静置させて、20分後に構造が完全なものである。フィルムは膨潤されるが、フィルムの境界及びエッジは24時間の後に依

然存在する。

【0015】HAが「活性化される」とは、その用語を本明細書中で用いる場合、HAを水性混合物中でHAに付いたカルボキシル基を求核作用に対して攻撃されやすくさせるように処理する場合に言う。「活性化剤」とは、HAを含む水性混合物中で、HAをそのように活性になるようにさせる物質である。

【0016】種々の反応条件下で、種々の求核性試薬を用いて活性化HAを改質することができる。本明細書中で用いる通りの「求核性試薬」とは、活性化HAと反応することができる電子に富んだ官能基（好ましくは、第一アミン）を保持する任意の分子である。

【0017】発明のゲル或はフィルムの製造或は使用において、架橋剤を使用しない。本明細書中で用いる通りの「架橋剤」とは、活性化HAと反応することができる求核性部分（例えばアミノ基のような）を2つ或はそれ以上含有する分子であり、或はHAのヒドロキシル基と反応することができる求電子性部分を2つ或はそれ以上含有する分子である。好ましい求核性試薬はバイオ適合性のものであるが、活性化HAと反応してバイオ適合性生成物となることのできる任意の求核性試薬を用いてよい。その上、ゲル及びフィルムは水不溶性であるから、使用する前に水で十分に洗浄して未反応物質を除くことができる。

【0018】また、発明のフィルム及びゲルは、染料或はステインを反応混合物に入れて、着色した形で作ることができる。このような着色フィルム及びゲルは、決まった場所にある際或は配置する間、見るのが一層容易であり、無着色のものに比べて外科手術中の取扱いを一層容易にさせることができる。

【0019】発明のゲル及びフィルムは、バイオ適合性でありかつ水不溶性であるので、組織を、例えば創傷の治癒を可能にするのに十分な期間のような長い期間の間、のける或は分離するつもりで外科エイドとして特に有用になることができる。

【0020】

【好ましい実施態様の説明】発明のゲル及びフィルムは一般的に下記の通りにして作る。HAを水に溶解し、生成した水性混合物のpHを下方向に調整し、次いで適当な活性化剤を混和して溶解したHAを活性化し、適当な求核性試薬を活性化HAに混和して、所望のゲルが生成するまで静置させる。活性化剤及び求核性試薬は任意の順序で混和することができる。発明のゲル及びフィルムの好ましい製造方法を今詳細に説明する。発明のゲル及びフィルムは、当業者ならばわかる通りに、発明の方法の範囲内であり、その上、本明細書中に記載するものと詳細な点で異なるプロトコルを使用して作ることができる。

【0021】ヒアルロン酸或はヒアルロン酸ナトリウムのようなヒアルロン酸の塩を水に溶解して水性混合物を

作る。種々の源の内の任意のものからのHAを使用することができる。HAは、よく知られている通りに、動物組織から抽出し或はバクテリア発酵の生成物として収穫することができる。ヒアルロン酸は、例えばPCT公表第W086/04355号に記載されている通りにしてバイオプロセス技術によって商業量で製造することができる。この第一水性混合物中のHAの濃度は0.4～2.6%重量/重量(「W/W」)の範囲であるのが好ましい。濃度が著しく低いと、続く反応がのろくなりかつ有効性が低くなり、濃度が著しく高いと、粘度が高いことにより、取扱いが困難である。

【0022】水性HA混合物は酸性にすべきであり、pH4.0～5.0を有するのが好ましく、pH4.75～5.0を有するのが一層好ましく、pH4.75を有するのが最も好ましい。pH値が低いと、好ましい活性化剤EDCは不安定であり、pH値が高いと、反応速度を減少させる。塩酸を加えてpHを調整するのが好ましいが、他の既知の酸を使用することができる。

【0023】一担、水性HA混合物のpHを調整したら、活性化剤を混和する。好ましい活性化剤はカルボジイミド、最も好ましくはEDC(いくつかの参考文献では、この物質は1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド或は「DEC」と呼ばれている)或はETC(1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドメチオジン)を含む。

【0024】次いで、求核性試薬を水性HA活性化剤混合物に混和する。好ましい求核性試薬は所定のアミノ酸エステル、一層好ましくはロイシン、イソロイシン、バリン、フェニルアラニン、ヒスチジン或はプロリンのメチルエステル、最も好ましくはL-ロイシンメチルエステルヒドロクロリドを含む。例えばエチル及びトープチルエステルを含むアミノ酸の他の置換エステルを使用することができ、例えばアニリンのような他の一官能価アミンを使用することができる。求核性試薬及び活性化剤をpH調整したHA混合物に、任意の順序で、一度に全てを或は徐々に混和することができる。

【0025】着色生成物を望むならば、染料或はステイン、例えばServaが「Serva Blue」として配布している青色染料「Brilliant Blue R」(また、「Coomassie(登録商標) Brilliant Blue R-250」としても知られている)をこの点で反応混合物に混和することができる。生成した生成物は青色を有し、体組織の色と良好な対比をなし、フィルム或はゲルを手術中取扱う間及び一担決まった場所において、見るのを容易にする。一担、試薬(有るとすれば、ステイン或は染料)を混和したら、反応混合物を単に当分静置させることができ、或は連続して或は時々攪拌する或はかきまぜることができる。

【0026】試薬を混和すると、pHが上がり、反応が進むにつれて酸を添加してpH4.75に保つことがで

きる。しかしながら、本発明者等は、種々の所望の物理的性質を有するフィルム及びゲルを、反応が進むにつれて単にpHを上昇させて得ることができることを見出した。試薬、特にEDC及び求核性試薬を添加する様式は臨界的なものでなく、これらの試薬対HAの比が重要である。本発明者等は、グルクロン酸残基1モル当量対EDC1.6モル当量の比が強いゲルを生じ、1:0.2の比が数日の期間にわたってつぶれて流動溶液になる弱いゲルを生じる。すなわち、EDC及び求核性試薬対HAの比は広い範囲にわたって変わることができるが、EDC対HA或は求核性試薬対HAの比は0.2:1より大きくするのが好ましい。一層好ましい比は使用する特定の求核性試薬及び最終生成物の所望の物理的性質に依存する。典型的には、値が小さい程、生成物は弱く、溶性になり、値が大きい程、生成物は強く、不溶性になるのが典型的である。

【0027】上記に従って改質したHAは簡単な方法でフィルムとしてキャストすることができる。反応混合物を所望の寸法及び形状を有する容器に注いで風乾させるのが代表的である。フィルムは厚く注いだ混合物を乾燥して作るのが普通であり、それで薄く、表面積/容積の大きい混合物を乾燥して形成するフィルムに比べて表面積/容積が小さく、強度が大きくなる。

【0028】別法として、水を逃散させる条件下でゲルを圧縮することにより、例えばゲルを、例えばEPO0193510号に記載されている通りにして、2つの表面であって、それらの内の少なくとも1つは多孔質であるものの間で圧縮することによる等でフィルムを形成することができる。

【0029】所望の場合、ゲル或はフィルムを使用する前に、例えば水或は1Mの塩化ナトリウム水溶液を灌流させることによって洗浄することができる。別法として、反応混合物を透析して残留試薬を除いた後にフィルムとしてキャストすることができる。フィルム或はゲルを治療用途に用いるつもりならば、洗浄して残留試薬或は試薬誘導物質、例えば置換尿素を除くことが望ましい。上述した通りにしてBrilliant Blue Rで青色に着色したゲル或はフィルムは、このように洗浄する間に着色を失わない。試薬或は反応生成物の除去は高圧液体クロマトグラフィーでモニターすることができる。

【0030】発明を下記の例で一層詳細に説明する。これらの例は例示として挙げるものであり、特許請求の範囲に記載する通りの他は、発明を制限するつものものではない。

【0031】

【実施例】

例1:本例では、EDCを活性化剤として及びロイシンメチルエステルヒドロクロリドを求核性試薬として用いて、ヒドロゲルを作製した。分子量 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ を有するヒアルロン酸ナトリウム(400mg;カル

ボキシル基1.0mモル)を蒸留水10mlに溶解した。水溶液のpHを、0.1N HClを添加してpH4.75に調整した。次いで、EDC 314mg(1.64mモル)を一度に全部加えた後に、L-ロイシンメチルエステルヒドロクロリド190mg(1.05mモル)を加えた。次いで、反応混合物のpHは2時間にわたって6.2に上昇した。反応混合物を室温に5時間保った後に、粘稠な不溶性ヒドロゲルを形成していた。このヒドロゲルを0.1M NaCl溶液で洗浄して残留試薬を除いて、その物理的性質を失わなかった。

【0032】例2：本例では、種々のEDC/ロイシン：HA比を用いて、ゲルの形成及び性質を比較した。ヒアルロン酸ナトリウム(400mg;カルボキシル基1.0mモル)を水15mlに溶解して用いて、手順を例1の通りにした。次いで、下記の量のEDC及びロイシンメチルエステルヒドロクロリドを別々の実験で加えた：EDC 153mg(0.8mモル)/ロイシンメチルエステルヒドロクロリド182mg(1.0mモル)；EDC 76mg(0.4mモル)/ロイシンメチルエステルヒドロクロリド90mg(0.5mモル)；EDC 38mg(0.2mモル)/ロイシンメチルエステルヒドロクロリド45mg(0.25mモル)。例1の通りにEDC及びロイシンメチルエステルヒドロクロリドの比が最も高い場合に、強いヒドロゲルが得られた。反応体の比が最も低い場合(0.2mモル/HAカルボキシル基0.25~1.0mモル)、弱いゲルが得られ、これは2週間後につぶれて流体になった。

【0033】例3：本例では、HA濃度を半分減らして生成するゲルの性質を比較した。手順は例1の通りにしたが、HA(400mg;カルボキシル基1.0mモル)を水15mlよりもむしろ30mlに溶解した(1-1/3%w/w HA)。ヒドロゲルが形成されたが、例1で得られたものよりも弱かった。

【0034】例4：本例では、EDCを活性化剤として及びロイシンメチルエステルヒドロクロリドを求核性試薬として用いて、フィルムを作製した。ヒアルロン酸ナトリウム(400mg;カルボキシル基1.0mモル)を蒸留水10mlに溶解した。溶液のpHを、0.1N HClを添加してpH4.75に調整した。次いで、EDC(314mg;1.64mモル)を単一部分で加えた後に、L-ロイシンメチルエステルヒドロクロリド190mg(1.05mモル)を加えた。反応混合物のpHは2時間の間に6.2に上昇し、その時間の後に溶液を面積6360mm<sup>2</sup>のペトリ皿に注ぎ、2日の期間にわたって乾燥させてフィルムにした。このようにして作ったフィルムは強く、水及び1M NaCl水溶液に不溶性であった。フィルムを例1の通りにして水或はNaCl水溶液で洗浄して残留試薬を除いて、それらの物理的性質を失わなかった。かかるフィルムの赤外分光分析は約2130cm<sup>-1</sup>におけるカルボジイミド吸収を示さず、約17

40cm<sup>-1</sup>、1700cm<sup>-1</sup>、1650cm<sup>-1</sup>及び1550cm<sup>-1</sup>における吸収を示した。

【0035】例5：本例では、フィルムを作るのに種々のHA濃度を用いて生成するフィルムの性質を比較した。HA(400mg;カルボキシル基1.0mモル)を蒸留水30ml、40ml或は100mlに溶解して作った3つの異なる初期HA濃度を用いて、例4に記載する手順を繰り返した。これらの初期濃度のHAの各々を用いて作ったフィルムは強くかつ水及び1M NaCl水溶液に不溶性であった、このことはHAを濃度範囲で用い得ることを示す。これらのフィルムの各々を、その物理的性質を失わないで、水或はNaCl水溶液で洗うことができた。

【0036】例6：本例は、反応混合物を透析した後にキャストしてフィルムを形成する効果を、フィルムを形成した後に洗浄するのと比較して示す。ヒアルロン酸ナトリウム(400mgの水に400mg)と、EDC(314mg;1.64mモル)と、L-ロイシンメチルエステルヒドロクロリド(190mg;1.05mモル)とを例4の通りにして反応させた。反応が完了した(2時間)際に、残留試薬を除くために、反応混合物を12,000MW カットオフ透析チュービングに通して、水に対して透析した。透析した混合物を、次いで、例4の通りにしてフィルムとしてキャストした。そのようにして得たフィルムは強くかつ水或は1M NaCl水溶液に不溶性であった。

【0037】例7：本例では、フィルムを一層厚く注いだ反応混合物を乾燥して形成して、混合物を異なる表面積/容積で乾燥させて作るフィルムの性質を比較した。例4の通りにして得た反応混合物(反応容積40ml)を小さいペトリ皿(面積3330mm<sup>2</sup>)にキャストした。そのようにして得たフィルムは1M NaCl水溶液及び水に不溶性であった(100℃;1時間)。

【0038】例8：本例では、他のアミノ酸エステル及びHAをEDCで活性にして用いて、フィルムを作製した。HAの溶液(H<sub>2</sub>O 40ml中400mg)を、0.1N HClを用いてpH4.7にもたらした。次いで、EDC(314mg;1.6mモル)を一度に全部加えた後に、アミノ酸誘導体1mモルを加えた。反応混合物をペトリ皿に注いで乾燥させた。L-バリンメチルエステルヒドロクロリド、L-イソロイシンメチルエステルヒドロクロリド、L-プロリンメチルエステルヒドロクロリド及びL-フェニルアラニンメチルエステルヒドロクロリドから不溶性フィルムが得られた。

【0039】例9：本例では、単純な第一アミン(アニリン)を求核性試薬として用いてフィルムを作製した。HAの溶液(H<sub>2</sub>O 40ml中400mg)を、0.1N HClを用いてpH4.7にもたらした。次いで、EDC(314mg;1.6mモル)を一度に全部加えた後に、アニリン1mモルを加えた。反応混合物をペトリ皿

に注いで乾燥させて不溶性フィルムが得られた。

【0040】例10：本例では、他のロイシンのエステルを用いてフィルムを作製した。HAの溶液（H<sub>2</sub>O 40ml中400mg）を、0.1N HClを用いて pH 4.7にもたらし、次いで、EDC（314mg；1.6mmol）を一度に全部加えた後に、ロイシンエステル1mmolを加えた。反応混合物をベトリ皿に注いで乾燥させた。L-ロイシンエチルエステルヒドロクロリド及びL-ロイシン- $\gamma$ -ブチルエステルヒドロクロリドの両方から不溶性フィルムが得られた。

【0041】例11：本例では、他のアミノ酸メチルエステルを用いてゲルを作製した。HAの溶液（H<sub>2</sub>O 15ml中400mg）を、pH 4.7にもたらし、EDC（314mg；1.6mmol）を加えた後に、アミノ酸誘導体（1mmol）を加えた。反応混合物は5～24時間以内に濃厚ゲルを形成した。L-バリンメチルエステルヒドロクロリド、L-イソロイシンメチルエステルヒドロクロリド、L-アルギニンメチルエステルヒドロクロリド、L-プロリンメチルエステルヒドロクロリド及びL-ヒスチジンメチルエステルヒドロクロリドを用いて、水不溶性ゲルが得られた。

【0042】例12：本例では、アミノ酸アミド（ロイシンアミド）を求核性試薬として用いてフィルムを作製した。HAの溶液（H<sub>2</sub>O 40ml中400mg）を、0.1N HClを用いて pH 4.7にもたらし、次いで、EDC（314mg；1.6mmol）を一度に全部加えた後に、L-ロイシンアミドヒドロクロリド1mmolを加えた。反応混合物をベトリ皿に注いで乾燥させて、不溶性フィルムが得られた。

【0043】例13：本例では、ロイシンエチルエステルヒドロクロリドを使用してゲルを作製した。HAの溶液（H<sub>2</sub>O 15ml中400mg）を、pH 4.7にもたらし、EDC（314mg；1.6mmol）を加えた後に、ロイシンエチルエステルヒドロクロリド（1.0mmol）を加えた。混合物は、5～24時間以内に濃い水不溶性ゲルを形成した。

【0044】例14：本例では、ETCをHA活性化剤として用いて、フィルム及びゲルを作製した。分子量 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ ダルトンの範囲を有するヒアルロン酸ナトリウム（400mg；カルボキシル基1.0mmol）を水（10ml及び30ml）に溶解した。各々の水溶液のpHを、0.1N HClを添加して pH 4.75に調整した。次いで、ETC 475mg（1.6mmol）を一度に全部加えた後に、L-ロイシンメチルエステル

ヒドロクロリド190mg（1.05mmol）を加えた。この反応混合物のpHは次の2時間にわたって pH 6.2に上昇した。水10mlを含有する反応混合物は不溶性ゲルを形成した。水30mlを含有する反応混合物は、乾燥した後に不溶性フィルムとなった。

【0045】例15：本例は着色フィルムの製造を例示する。HAの溶液（H<sub>2</sub>O 30ml中400mg）を例13の通りにして pH 4.75にもたらし、次いで、ETC（475mg；1.6mmol）及びロイシンメチルエステルヒドロクロリド（190mg；1.05mmol）を加えた。次いで、H<sub>2</sub>O（0.5ml）に溶解した「Serva Blue」（5mg/ml）染料の希薄溶液を反応混合物に加えた。生成した混合物をベトリ皿に注いで、16時間後に、水不溶性青色フィルムが得られた。フィルムを1M NaCl、次いでH<sub>2</sub>Oで洗浄した際に、フィルムは青色を保持した。

【0046】例16：本例は化学的に改質したHAのフィルムの組織バイオ適合性を例示する。例4に記載する手順に従って作製したフィルムの4つのストリップ及び2つのUSPネガティブ対照ストリップをホワイトニュージランドウサギ（試験当り2匹）の脊椎傍筋肉に外科手術により移植した。試験部位を72時間後に肉眼により或は7日後に完全な組織病理学によるかのいずれかで評価した。USP XXI、1237頁に従って、試験物質はUSPインプランテーションテストフォーゴイバルエーション オブ プラスチック マテリアルズの要件を満足した。

【0047】

【発明の用途】発明のフィルム或はゲルは、例えば De Belder等のPCT公表第WO 86/00912号に記載されている通りにして、外科分野において知られている手順に従って、手術後或は治療する期間の間、体組織が癒着或は付着しないようにさせる外科用エイドとして使用することができる。外科手術の間離したままにするための組織の間或は中に、ゲル或はフィルムを適した通りに1片或はそれ以上挿入或は注入する。

【0048】発明のフィルム或はゲルは、また、持放薬剤送達用にも用いることができる。送達させる薬剤を、例えば、ニューヨーク、Marcel Dekker Inc., T.J. Roseman 等、Controlled Release Delivery Systems, 1983年、6章、107～109頁に R.V. Sparer等が記載する通りに、ゲル或はフィルムに共有結合させることができる。次いで、ゲル或はフィルムを、送達を望む場所に移植或は注入することができる。

フロントページの続き

(72)発明者     アチャリヤ, ラクシャ   エイ.  
                アメリカ合衆国 01532 マサチューセ  
                ッツ, ノースボロ, ウェスト   ストリー  
                ト 12

(72)発明者     ワッツ, アラン   イー.  
                アメリカ合衆国 02146 マサチューセ  
                ッツ, ブルックライン, マリオン   スト  
                リート 100, ナンバー46